

ENT COOPERATION TREA /

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

MIYAZAKI, Chikara
Nishimura Building
6-5, Tanimachi 1-chome
Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka 540-0012
JAPON

Date of mailing (day/month/year)
09 May 2000 (09.05.00)

Applicant's or agent's file reference
F-370PCT

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/JP99/02442

International filing date (day/month/year)
12 May 1999 (12.05.99)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☐ the inventor ☒ the agent ☐ the common representative

Name and Address

MIYAZAKI, Chikara
Nishimura Building
6-5, Tanimachi 1-chome
Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka 540-0012
Japan

宮崎主税

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

MIYAZAKI, Chikara
Nishimura Building
6-5, Tanimachi 1-chome
Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka 540-0012
Japan

宮崎主税

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned
☒ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Susumu Kubo

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USP)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 25 November 1999 (25.11.99)	
International application No.: PCT/JP99/02442	Applicant's or agent's file reference: F-370PCT
International filing date: 12 May 1999 (12.05.99)	Priority date: 15 May 1998 (15.05.98)
Applicant: YOKOI, Masayuki et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:
19 July 1999 (19.07.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

THIS PAGE BLANK (00)



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 G01N 33/543, 33/542</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/60401</p> <p>(43) 国際公開日 1999年11月25日(25.11.99)</p>												
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/02442</p> <p>(22) 国際出願日 1999年5月12日(12.05.99)</p> <p>(30) 優先権データ</p> <table border="0"> <tr> <td>特願平10/133995</td> <td>1998年5月15日(15.05.98)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平10/366818</td> <td>1998年12月24日(24.12.98)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平10/366819</td> <td>1998年12月24日(24.12.98)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平10/366820</td> <td>1998年12月24日(24.12.98)</td> <td>JP</td> </tr> </table> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 積水化学工業株式会社 (SEKISUI CHEMICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒530-8565 大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 横井正之(YOKOI, Masayuki)[JP/JP] 〒525-0031 滋賀県草津市若竹町3-7 Shiga, (JP) 赤峰隆之(AKAMINE, Takayuki)[JP/JP] 〒569-0095 大阪府高槻市八丁西町3-19 Osaka, (JP) 吉川勝己(YOSHIKAWA, Katsumi)[JP/JP] 〒573-0018 大阪府枚方市桜ヶ丘町45-2-403 Osaka, (JP)</p>		特願平10/133995	1998年5月15日(15.05.98)	JP	特願平10/366818	1998年12月24日(24.12.98)	JP	特願平10/366819	1998年12月24日(24.12.98)	JP	特願平10/366820	1998年12月24日(24.12.98)	JP	<p>(74) 代理人 宮崎主税, 外(MIYAZAKI, Chikara et al.) 〒540-0012 大阪府大阪市中央区谷町1丁目6番5号 西村ビル Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, NZ, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
特願平10/133995	1998年5月15日(15.05.98)	JP												
特願平10/366818	1998年12月24日(24.12.98)	JP												
特願平10/366819	1998年12月24日(24.12.98)	JP												
特願平10/366820	1998年12月24日(24.12.98)	JP												
<p>(54)Title: IMMUNOASSAY REAGENTS AND IMMUNOASSAY METHOD</p> <p>(54)発明の名称 免疫測定試薬および免疫測定法</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Immunoassay reagents by which an ultramajor constituent (for example, an antigen or an antibody) contained in a specimen can be assayed at a high sensitivity without requiring any operation for separating, for example, immunologically reacted components from unreacted ones, or while simplifying such an operation. These immunoassay reagents aim at quantitating an antigen or an antibody to be assayed in a specimen and contain an insoluble support carrying an antibody or an antigen against the above-mentioned antigen or antibody and an enzyme, an enzyme inhibitor inhibiting the activity of the above enzyme, and a substrate of the above enzyme.</p>														

(57)要約

試料中の抗原または抗体などの超微量成分を高感度で測定でき、免疫反応等により反応した成分と未反応成分との分離が必要でない、あるいはこのような分離を簡便化し得る、免疫測定試薬を得る。

試料中の測定対象物質である抗原または抗体の量を測定するための免疫測定試薬であり、抗原または抗体に対する抗体または抗原と酵素とが担持された不溶性担体と、上記酵素の活性を阻害する酵素阻害剤と、上記酵素の基質とを含む免疫測定試薬。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	HR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HU	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CC	中央アフリカ	ID	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	IE	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IL	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IS	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IT	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	JP	イタリア	NL	オランダ	YC	ユーゴスラビア
CU	キューバ	KE	ケニア	NO	ノールウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KR	韓国	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク			RO	ルーマニア		

明 細 書

免疫測定試薬および免疫測定法

5 技術分野

本発明は、不溶性担体を利用する免疫測定試薬および免疫測定法、特に、測定対象物質を高感度で測定可能な免疫測定試薬および免疫測定法に関する。

10 背景技術

臨床検査の分野では、生体試料（血液、尿など）を用いて種々の疾患の診断を行っているが、これらを診断する方法として、種々の測定法が開発され利用されている。これらの測定法の代表的方法として、酵素反応を利用する生化学測定法や抗原抗体反応を利用する免疫測定法が挙げられる。近年においては、生体試料中の成分を精度よく測定することが望まれ、特異性の高い抗原抗体反応を利用した免疫測定法が盛んに用いられている。

免疫測定法としては、免疫比濁法（T I A法）、ラテックス比濁法（L I A法）、酵素免疫測定法（E I A法）、放射免疫測定法（R I A法）などが挙げられ、目的に応じて使い分けされている。すなわち、生体試料中に含まれている成分の量が比較的多い場合は、T I A法やL I A法が使用されている。T I A法やL I A法では、測定される生体試料中の成分としては、例えば、C反応性タンパク質（C R P）、抗ストレプトリジン-O抗体（A S O）、フィブリン分解産物（F D P）などが挙げられ、生体試料中の濃度として、数n g / m L以上の場合に用いられる。これに対して、生体試料中に含まれる成分の量が微量の場合は、

E I A 法や R I A 法が使用され、測定する生体試料中の成分としては、例えば、 α フェトプロテイン (A F P) に代表される癌マーカーやインシュリンに代表されるホルモンなどが挙げられ、生体試料中の濃度として、数 n g / m L 以下の場合に用いられる。

- 5 更に、近年、生体試料中の微量成分の測定が重要視され、E I A 法や R I A 法などが益々利用されてきている。しかしながら、T I A 法や L I A 法では測定に要する時間が短く、操作が簡便で種々の自動分析装置（以下、汎用自動分析装置）へ適用可能であるのに比べて、E I A 法や R I A 法では反応時間が長く、操作法が煩雑で、かつ、使用する酵素や
- 10 放射性同位元素の種類が多岐にわたる。従って、E I A 法や R I A 法は、特定の自動分析装置（以下、専用自動分析装置）においてのみ用いられることが多く、R I A 法に至っては放射性同位元素を利用するため特定の施設が必要というような種々の問題がある。

- 15 近年、生体試料中の微量成分の測定においては、癌などの早期発見やエイズウイルスなどの感染初期を診断するため、超微量でも測定できる方法が要望されている。超微量測定が可能な手法としては、L I A 法や E I A 法の変法または改良法など測定法自体の精度を上げる手法と、L I A 法や E I A 法などでは従来からの方法で測定に使用する装置の性能を上げる手法に大別され、一部実用化されている。

- 20 測定法自体の精度を上げる手法としては、L I A 法の不溶性担体を着色する方法（特開平 1 - 2 1 4 7 6 0 号公報）、E I A 法の抗原または抗体を標識する物質として酵素の代わりに、発光物質を利用する方法（特開平 5 - 3 4 3 4 6 号公報）などが挙げられる。また、装置の性能を上げる手法として、特開平 3 - 1 6 7 4 7 5 号公報に提案される方法
- 25 がある。

しかしながら、これらのいずれの手法においても、汎用自動分析装置

への適用は不可能であり、専用自動分析装置が必要という問題は解決されていない。専用自動分析装置が必要な理由は、上述のように、E I A法やR I A法に代表される微量成分の測定法では、反応時間、操作法、使用する酵素や放射性同位元素の種類などが測定法により種々異なることによる。さらに、これら以外の大きな理由として、現在、開発または上市されている微量成分の測定法では、B / F 分離と呼ばれる操作（Bは免疫反応等により結合した成分、Fは未反応の成分）が必ず必要であるため、B / F 分離操作のできない汎用自動分析装置へは適用できず、B / F 分離操作のできる専用自動分析装置が必要となってくる。

10 最近、特開平 5 - 2 4 9 1 1 2 号公報、特開平 7 - 1 7 9 4 9 5 号公報などにみられるように、B / F 分離の不必要な測定法も提案、開発されている。しかしながら、感度不足や、測定時間が長いなどの問題により、専用自動分析装置が必要となったり、一部の汎用自動分析装置にしか適用できないなどの問題がある。

15 一方、臨床検査の現場においては、超微量分析を行うには高価な専用自動分析装置が必要で、かつ、設置場所を確保しなければならないため、汎用自動分析装置による超微量成分の測定を望む声が多い。

20 以上のように、現在、開発または上市されている超微量成分の測定は、ユーザーの強い要望があるにもかかわらず、B / F 分離操作が必要なため、専用自動分析装置での測定に限られているという大きな問題点がある。

また、臨床現場では一つの生体試料より複数の項目を測定することが多く、そのため一つの生体試料を繰り返し違う方法で測定することが多々あり、測定時間がその分長くかかったり、測定者が生体試料に触れる機会が多くなり感染の危険があるという問題があった。

25

発明の要約

本発明の目的は、上述した従来技術の欠点を解消し、試料中の抗原または抗体などの超微量成分を高感度で測定することができ、B / F 分離を必要としないか、あるいはB / F 分離を簡便化して、簡便に上記超微量成分を測定することを可能とする免疫測定試薬および免疫測定法を提供することにある。

本願の第1の発明は、試料中の測定対象物質である抗原または抗体の量を測定するための免疫測定試薬であって、(a) 上記抗原または抗体に対する抗体または抗原と酵素とが担持された不溶性担体と、(b) 上記酵素の活性を阻害する酵素阻害剤と、(c) 上記酵素の基質とを含むことを特徴とする。

第1の発明の特定の局面では、上記不溶性担体を含む第1の試薬と、上記酵素阻害剤及び上記基質を含む第2の試薬とが用意される。

本願の第2の発明は、試料中の測定対象物質である抗原または抗体の量を測定するための免疫測定試薬であって、(a) 上記抗原または抗体に対する抗体または抗原と酵素阻害剤とが担持された不溶性担体と、(b) 上記酵素阻害剤により活性が阻害される酵素と、(c) 上記酵素の基質とを含むことを特徴とする。

第2の発明に係る免疫測定試薬の特定の局面では、上記不溶性担体を含む第1の試薬と、上記酵素を含む第2の試薬と、上記基質を含む第3の試薬とが用意される。

第1、第2の発明に係る免疫測定試薬では、好ましくは、不溶性担体中に、磁性物質または可磁化物質が含有される。

また、第1、第2の発明に係る免疫測定試薬では、上記抗体または抗原、酵素阻害剤及び酵素の組み合わせが複数用いられ、それによって複数種の抗原または抗体の量を測定することができる。

本願の第 3 の発明は、試料中の測定対象物質である抗原または抗体の量を測定するための免疫測定試薬であって、（a）酵素阻害剤と化学結合された上記抗原または抗体に対する抗体または抗原と、（b）上記酵素阻害剤により活性が阻害される酵素と、（c）上記酵素の基質とを含むことを特徴とする。

第 3 の発明の特定の局面では、免疫測定試薬は、上記酵素阻害剤と化学結合された抗体または抗原を含む第 1 の試薬と、上記酵素を含む第 2 の試薬と、上記基質を含む第 3 の試薬からなる。

第 1 ～第 3 の発明に係る免疫測定試薬のある特定の局面では、上記酵素阻害剤として、酵素に対する抗体が用いられ、より特定の局面では、モノクローナル抗体が用いられる。

本願の第 4 の発明は、第 1，第 2 または第 3 の発明に係る免疫測定試薬を用いた免疫測定法である。この免疫測定法では、測定対象物質である抗原または抗体を含む試料と、第 1，第 2 または第 3 の発明に係る免疫測定試薬とが混合され、その結果、抗原抗体反応による凝集反応と酵素反応とが引き起こされる。そして、引き起こされたこれらの反応の度合いを測定することにより、抗原または抗体の量が測定される。

発明の詳細な説明

第 1 の発明では、免疫測定試薬は、（a）抗体または抗原と酵素とが担持された不溶性担体と、（b）酵素阻害剤と、（c）基質とを含む。使用に際して、これらの成分を予め混合しておく、と、酵素と基質との反応が先に進んでしまったり、酵素阻害剤により酵素の活性が失われるおそれがある。そこで、通常、上記不溶性担体（a）を含む第 1 の試薬と、酵素阻害剤及び基質を含む第 2 の試薬とに分けて用意される。

生体試料中の測定対象物質である抗原または抗体に対する抗体または

抗原と酵素とを担持させた不溶性担体を含む第 1 試薬と、上記酵素の活性を阻害する酵素阻害剤（以下、酵素阻害剤という）と上記酵素の基質を含む第 2 試薬とを、上記測定対象物質が含まれている生体試料と混合すると、以下の第 1、第 2 の反応が進行する。第 1 の反応は、生体試料中の抗原または抗体と不溶性担体に担持された抗体または抗原との抗原抗体反応である。この第 1 の反応の原理は L I A 法の原理と同じであり、第 1 の反応により、不溶性担体の凝集が起こり、濁度が上昇し吸光度変化が生じる。一方、第 2 の反応は酵素と基質とによる反応であり、この反応の原理は E I A 法の検出と同じであり、基質が変化することにより、吸光度変化が生じる。

第 1 の反応と第 2 の反応は互いに独立してかつほぼ同時に起きるため、吸光度変化量は L I A 法の場合に比べて大きくなり、生体試料中の微量成分の測定が可能となる。しかしながら、第 1 の反応では、生体試料中に含まれる抗原または抗体の量に依存して吸光度が変化するが、第 2 の反応は、酵素と基質の反応であるため、生体試料中に含まれる抗原または抗体の量に依存した反応ではない。

そこで、本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、酵素阻害剤を該反応系に添加すれば、第 2 の反応が生体試料中の抗原または抗体の量に依存するようになることを見出した。酵素阻害剤は、酵素に結合されると、酵素の活性を失活または減少させる。生体試料中に抗原または抗体が含まれていない時は、第 1 の反応による不溶性担体の凝集が生じていないため、酵素阻害剤が不溶性担体上の酵素に結合して酵素を失活させ、第 2 の反応による吸光度変化を生じさせない。これに対して、生体試料中に抗原または抗体が含まれると、第 1 の反応による不溶性担体の凝集が生じる。この時、凝集に関与している不溶性担体上の酵素と酵素阻害剤との結合が、凝集塊の立体障害のために起こりにくくなる。従って、酵

素が失活せず、基質と反応し、吸光度変化が生じる。

このようにして、酵素阻害剤を該反応系に添加することにより、第2の反応も生体試料中の抗原または抗体の量に依存した反応とすることができる。このように、第1の発明の免疫測定法では、第1の反応と第2の反応が共に、生体試料中の抗原または抗体の量に依存した反応となるため、L I A法より高感度であり、かつ、E I A法などと違って、B / F分離を必要としないか、簡易なB / F分離を得るだけでよい。

第2の発明においては、抗体または抗原と、酵素阻害剤とが担持された不溶性担体（a）、酵素（b）及び基質（c）を含む免疫測定試薬が用いられるが、これらの成分を予め混合しておく、第1の発明の場合と同様に、酵素と基質との反応が進んだり、酵素が失活したりする。

従って、通常、第2の発明に係る免疫測定試薬では、不溶性担体を含む第1の試薬と、酵素を含む第2の試薬と、基質を含む第3の試薬とが用意される。この場合、第1の試薬と上記測定対象物質が含まれている生体試料とを混合すると、生体試料中の抗原または抗体と不溶性担体に担持された抗体または抗原との抗原抗体反応（第1の反応）が起こり、不溶性担体の凝集が生じる。次に、第2の試薬を添加すると、第2の試薬中の酵素と不溶性担体に担持された酵素阻害剤との反応（第2の反応）が起こるが、第2の反応は生体試料中の抗原または抗体の量に依存する。酵素阻害剤が酵素と反応すると、酵素活性を失活または減少させるが、生体試料中に抗原または抗体が含まれていない時は、第1の反応による不溶性担体の凝集が生じていないため、不溶性担体上の酵素阻害剤が酵素と反応して酵素を失活させる。従って、第3の試薬を添加しても、第2の反応による吸光度変化は生じない。

これに対して、生体試料中に抗原または抗体が含まれていると、その含有量に応じて、第1の反応による不溶性担体の凝集が生じる。この時、

凝集に関与している不溶性担体上の酵素阻害剤と酵素との反応は、凝集塊の立体障害のため起こりにくくなる。従って、酵素がほとんど失活しないので、第 3 の試薬を添加すると、酵素が基質と反応し、吸光度変化を生ずる。

- 5 このようにして、酵素阻害剤を不溶性担体に担持させることにより、第 2 の反応も生体試料中の抗原または抗体の量に依存させることができるようになる。このように、第 2 の発明の免疫測定試薬および免疫測定法においても、第 1 の反応と第 2 の反応が共に、生体試料中の抗原または抗体の量に依存した反応となる。

- 10 また、上記のようにして、第 1 の発明の場合と同様に、L I A 法より高感度であり、かつ、E I A 法などと違って、B / F 分離が不要か、または簡便な免疫測定試薬および免疫測定法が得られる。

- 15 また、第 1, 第 2 の発明に係る免疫測定試薬では、不溶性担体中に磁性物質または可磁化物質が含有されていてもよい。不溶性担体中に、磁性物質または可磁化物質が含有されているものを用いると、反応が全て終わった後、反応容器下部から可磁化物質または磁石で不溶性担体を吸い寄せることにより、溶液と不溶性担体を分離することができる。このようにすれば、不溶性担体の濁度上昇の影響を受けることなく、溶液の発色程度のみを測定することができる。

- 20 さらに、第 1, 第 2 の発明に係る免疫測定試薬では、上記抗体または抗原、酵素及び酵素阻害剤の組み合わせが複数種用いられてもよい。その場合には、複数種の抗原または抗体の量を測定することができる。

- 25 加えて、上記のように、不溶性担体中に磁性物質または可磁化物質が含有されており、上記のように抗体または抗原、酵素及び酵素阻害剤の組み合わせが複数種用いられる場合には、不溶性担体の凝集による濁度上昇の変化に影響されず、それぞれの酵素の発色のみを測定することが

できるので、2種類以上の抗原または抗体の測定を一度に行うことができる。

5 なお、第1、第2の発明においては、免疫測定試薬を構成するにあたり、上記第1、第2の試薬あるいは第1～第3の試薬を組み合わせた形態とする必要は必ずしもない。すなわち、第1の発明に係る免疫測定試薬においては、試料と混合する際に、上記不溶性担体（a）、酵素阻害剤（b）及び基質（c）を一度に混合し、直ちに測定すべき試料とを混合してもよい。同様に、第2の発明においても、免疫測定試薬を構成する各成分を混合し直ちに測定試料と混合してもよい。このように、条件
10 を整えれば、第1、第2の発明に係る免疫測定試薬は、必ずしも、上述したように第1、第2の試薬あるいは第1～第3の試薬に分けて用意する必要はない。

 第3の発明に係る免疫測定試薬では、酵素阻害剤と抗体または抗原が化学結合されている。ここでは、まず第1の反応として、酵素阻害剤と
15 化学結合されており、かつ生体試料中の測定対象物質である抗原または抗体に対する抗体または抗原（以下、コンジュゲートという）と上記試料とが混合されることにより、上記抗体または抗原と試料中の抗原または抗体が反応することにより凝集反応が起こる。この凝集反応の結果、立体障害またはコンジュゲート中の酵素阻害剤のコンフォメーション変
20 化が起こることにより、酵素阻害剤が失活し、酵素阻害作用が弱まる。すなわち、酵素阻害作用は抗原抗体反応の凝集の度合いに応じて弱くなる。

 次に、第2の反応として、酵素阻害剤はその活性に応じて、酵素の働きを阻害するので、系中に存在する酵素はその酵素阻害剤の活性に応じて失活する。
25

 最後に、第3の反応として、酵素と基質の反応により発色するので、

その度合いを測定することにより、酵素の失活の度合いを知ることができる。すなわち、最終的に基質により酵素活性を測定することにより、凝集の度合いを検出することができる。

5 以上を要約すると、測定対象物質とコンジュゲートが抗原抗体反応を起こして凝集することにより、コンジュゲート中の酵素阻害剤の酵素阻害作用が弱まる。しかる後、凝集の度合いを反映して該酵素阻害剤の作用により酵素が失活するので、系中の酵素の活性を基質を添加することにより測定すれば、系中の測定対象物質の測定を行うことができる。

10 このように、本発明の免疫測定試薬および免疫測定法は、第1、第2、第3の反応が共に、生体試料中の抗原または抗体の量に依存した反応となるため、LIA法より高感度であり、かつ、EIA法などと違って、B/F分離の必要がない新規な免疫測定試薬および免疫測定法となる。

15 なお、上記説明における第1～第3の反応は説明のために3段階に分けたが、実際の測定に用いられる試薬は3種類に分けておく必要はなく、適当な条件を選ぶことにより、適宜組み合わせで1又は2種類としてもよいし、あるいは、3種類以上としてもよい。

20 第1～第3の発明により測定される測定対象物質としては、生体試料中の抗原または抗体が挙げられ、例えば、肝炎（B型、C型）由来抗原または抗体；HIV抗原または抗体；梅毒由来抗原または抗体； α -フェトプロテインに代表される癌マーカー；インシュリンに代表されるホルモン；オートコイドなどが挙げられるが、特にこれらに限定されない。

25 また、第1、第2の発明において用いられる上記不溶性担体としては、例えば、有機高分子粉末、微生物、血球および細胞膜片等が挙げられる。有機高分子粉末としては、例えば、不溶性アガロース、セルロース、不溶性デキストランなどの天然高分子粉末；ポリスチレン、スチレン-スチレンスルホン酸（塩）共重合体、スチレン-メタクリル酸共重合体、

- アクリロニトリル-ブタジエンスチレン共重合体、塩化ビニル-アクリル酸エステル共重合体、酢酸ビニル-アクリル酸エステル共重合体などの合成高分子粉末などが挙げられる。特に、合成高分子粉末を均一に懸濁させたラテックスが好ましい。上記不溶性担体は、その使用目的・
- 5 用途などにより異なるが、通常、化学合成により製造するか、または、市販されているものを使用する。また、表面にスルホン酸基やカルボキシル基などを導入した不溶性担体も適宜使用可能である。上記ラテックスを用いる場合、そのラテックス粒子の粒径は、 $0.05 \sim 1.5 \mu\text{m}$ が好ましく、 $0.1 \sim 0.6 \mu\text{m}$ がより好ましい。
- 10 また、第1, 第2の発明において、上記不溶性担体に磁性物質または可磁化物質を含有させる場合、磁性物質としてはフェライトなどを挙げることができ、可磁化物質としては酸化鉄などを挙げることができる。この可磁化物質が含有された不溶性担体の具体的な例としては、例えば、ベリタス社製、商品名：ダイナビーズを挙げることができる。
- 15 第1～第3の発明に係る免疫測定試薬において用いられる上記酵素としては、基質と反応して吸光度変化を生じるものであれば特に限定されない。例えば、パーオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼなどが挙げられるが、特にこれらに限定されない。酵素には、天然物から得られたもの、遺伝子工学的手法により得られたもの
- 20 などあるが、いずれも使用可能である。通常は、天然物から得られたものを使用すればよい。
- また、上記酵素を測定に使用する際は、適当な緩衝液などで希釈して用いる。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グリシン緩衝液、Good緩衝液などが挙げられるが、特に限定されず、
- 25 使用する酵素や基質の特性を考慮し、適宜選択すればよい。酵素の使用時の濃度としては、 $0.001 \sim 10 \text{ IU/mL}$ が好ましいが、使用する

酵素の種類により異なるため、この範囲に限定されるわけではない。

次に、第1～第3の発明に係る免疫測定試薬で用いられる上記基質としては、使用する酵素と反応して吸光度変化を生じるものが用いられる。例えば、酵素としてパーオキシダーゼを使用する場合は基質として過酸化水素水にN-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリンを加えたもの、または、過酸化水素水にo-フェニレンジアミンやピロガロールを加えたもの、酵素としてアルカリフォスファターゼを使用する場合は基質としてp-ニトロフェニルリン酸、酵素として β -ガラクトシダーゼを使用する場合は基質としてo-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシドなどが挙げられるが、特に限定されず、目的・用途に応じて適宜選択される。

上記の基質は、通常、化学合成により製造するか、または、市販されているものを使用する。測定に使用する際は適当な緩衝液などに溶解・希釈して用いる。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グリシン緩衝液、Good緩衝液などが挙げられるが、特に限定されず、使用する酵素や基質の特性を考慮し、適宜選択すればよい。基質の使用時の濃度としては、0.1～1000mMが好ましいが、使用する基質の種類により異なるため、この範囲に限定されるわけではない。

また、第1～第3の発明に係る免疫測定試薬で用いられる酵素阻害剤としては、使用する酵素と結合して酵素活性を失活させるものであれば、特に、限定されず、例えば、ペプチド、抗体、フッ素化合物、イオウ化合物など、使用する酵素によりそれに対応した酵素阻害剤を用いる。

酵素阻害剤として、酵素に対する抗体（以下、抗酵素抗体という）を用いる場合は、抗体種としてはポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれでもよく、また、製造方法についても、公知の方法のいずれでもよい。ポリクローナル抗体であれば、ウサギ、山羊、めん羊などの

動物に、使用する酵素を免疫して産生させればよい。モノクローナル抗体についても公知の方法を用いて得ることができる。

5 このようにして得られた抗体については公知のクロマトグラフィーなどによって適宜精製してもよいし、場合によっては特別の精製をせずに用いてもよい。また、測定に使用する際は適当な緩衝液などで希釈して用いる。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グリシン緩衝液、G o o d緩衝液などが挙げられるが、特に限定されず、使用する酵素や基質の特性を考慮し、適宜選択すればよい。

10 酵素阻害剤の使用時の濃度としては、0. 0 1～1 0 m g / m L が好ましいが、使用する酵素阻害剤の種類により異なるため、この範囲に限定されるわけではない。

第1の発明で用いる、抗原または抗体に対する抗体または抗原と酵素とを担持させた不溶性担体（a）を製造する方法について説明する。

15 不溶性担体への抗体または抗原及び酵素の結合方法は、使用する抗体または抗原及び酵素の種類により異なるが、通常、以下に示す方法で行う。抗体または抗原を含む溶液と酵素を含む溶液を同時に、または、順次、不溶性担体の懸濁液に添加し攪拌すると、物理的吸着により抗体または抗原と酵素とが不溶性担体に結合する。

20 また、表面にスルホン酸基やカルボキシル基が導入されている不溶性担体については、適当な架橋剤を添加することにより、抗体または抗原と酵素を不溶性担体に結合させることができる。この場合、架橋剤で架橋できるように、抗体または抗原と酵素を修飾する必要がある。物理的に吸着させるか、架橋剤により結合させるかは、使用する抗体または抗原と酵素の物性や構造を考慮に入れ、適宜選択すればよい。

25 上記結合反応時のp Hは3～1 0、温度は2～5 0℃が好ましい。p Hがこの範囲をはずれると、抗体または抗原がタンパク質であるため変

性してしまうなどの問題がある。また、温度については、2℃未満であれば反応速度が遅く、所望の感度を有するものが得にくくなり、50℃を超えると、抗体または抗原が変性してしまうなどの問題がある。

5 なお、第2の発明では、第1の発明における不溶性担体（a）の調製に際し、酵素の代わりに酵素阻害剤を固定すればよい。

 また、第3の発明に係る免疫測定試薬では、酵素阻害剤が抗体または抗原に化学結合されるが、このような酵素阻害剤と化学結合されている抗体または抗原の製造方法は、以下のとおりである。

10 測定対象物質である抗原に対する抗体または同じく測定対象物質である抗体に対する抗原と酵素阻害剤の化学結合方法は、使用する抗体または抗原および酵素阻害剤の種類により異なるが、公知の方法の中から適宜最適の方法を選択すればよい。例えば、カルボキシル基をクロル炭酸エチルまたはクロル炭酸ブチルと反応させ、活性を有する混合酸無水物に誘導し、相手方のアミノ基に反応させてアミド結合を形成する混合酸
15 無水物法；カルボキシル基をカルボジイミド型縮合剤を使用して、活性エステル型に変えてから、相手方のアミノ基に反応させる活性エステル法；グルタルアルデヒドを用いる方法；過ヨウ素酸を用いる方法などが挙げられる。使用する抗体または抗原と酵素阻害剤の結合比率は、酵素阻害剤にポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を使用する場合
20 は、（抗体または抗原）：（酵素阻害剤）＝20：1～1：1が好ましく、より好ましくは10：1～1：1、より好ましくは5：1～1：1である。

 本発明に係る免疫測定方法では、第1～第3の発明に係る免疫測定試薬と、抗原または抗体を含む測定試料とが混合され、抗原抗体反応による凝集反応と酵素反応とが引き起こされる。そして、これらの反応の度
25 合いを測定することにより、抗原または抗体の量が測定される。

ここで、上記反応の度合いを測定する方法については、特に限定されるわけではないが、通常、反応生成物の光学的性質を検出する方法が通常用いられる。光学的検出方法としては、最も汎用される吸光などによる色調変化の検出の他に、蛍光、化学発光、生物発光などが挙げられる。

- 5 光学的測定方法も波長測定その他、時間分解蛍光法なども挙げられるが特に限定されず、目的・用途に応じて適宜選択される。

- 上記測定波長の一例を挙げると、250～1000 nm程度の波長を用いることができる。また、この測定法において、抗原抗体反応および酵素反応の条件は通常の場合と同様であり、反応媒体としては、各種緩衝液が用いられる。この緩衝液は、生体試料中の抗原または抗体を失活させることなく、かつ、抗原抗体反応および酵素反応を阻害しないようなイオン強度及びpHを有するものであればよい。例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グリシン緩衝液などが使用される。反応温度は、10～50℃、特に20～40℃が好ましい。

15

図面の簡単な説明

図1は、実施例1によって得られた検量線であり、縦軸は600 nmにおける吸光度変化量を、横軸は血清中のHBs抗原力価（I. U. / ml）を示す。

- 20 図2は、実施例2によって得られた検量線であり、縦軸は600 nmまたは420 nmにおける吸光度変化量を、横軸は血清中のHBs抗原力価（I. U. / ml）またはCRP濃度（mg / dl）を示す。

実施例の説明

- 25 （実施例1）

（1）免疫測定試薬の調製

ポリスチレンラテックス（粒径 0.4 μ m、積水化学工業社製）の 0.02 重量%リン酸緩衝液（pH 5.0、50 mM）分散液を 25℃で保持したもの 1 ml に、抗ヒト HBs 抗原ヤギ抗体の 1 mg/ml リン酸緩衝液（pH 5.0、50 mM）溶液の 50 μ l、および、西洋ワサビペルオキシダーゼの 1 mg/ml リン酸緩衝液（pH 5.0、50 mM）溶液の 50 μ l を添加し、25℃で 1 時間攪拌した。

次に、15000 rpm で 15 分間、遠心分離を行い、上清を除き、沈殿物をリン酸緩衝液（pH 5.0、50 mM）1 ml に分散させ第 1 試薬とした。

次に、抗西洋ワサビペルオキシダーゼモノクローナル抗体の 0.4 mg/ml 溶液の 1 ml、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリンの 1 mg/ml 溶液の 1 ml、2 mM の 4-アミノアンチピリン溶液の 1 ml、および、10 mM の過酸化水素溶液の 1.2 ml をリン酸緩衝液（pH 7.0、50 mM）10 ml に溶解し、第 2 試薬とした。

すなわち、本実施例の免疫測定試薬は、上記第 1 試薬と第 2 試薬とからなる。

（2）次いで、この免疫測定試薬を用いて、標準 HBs 抗原による検量線を作成し、次いで HBs 抗原陽性血清を検体として、その中の HBs 抗原力価を測定した。

（2-1）標準 HBs 抗原

HBs 抗原を 0, 10, 25, 50, 75, 100 I. U. /ml 濃度で含むヒト血清を標準品として使用した。

（2-2）検量線の作成

日立自動分析装置 7150 型を用いて測定した。上記（2-1）項の標準 HBs 抗原液 20 μ l と上記第 1 試薬 120 μ l とを混合し、37

℃で10分保持した後、上記第2試薬120 μ lを添加し、その後、1分および10分後に吸光度を波長600nmで測定した。この差を吸光度変化とした。標準HBs抗原力価と吸光度変化の関係の検量線を図1に示した。図1において、縦軸は600nmにおける吸光度変化量を、横軸は血清中のHBs抗原力価（I. U. /ml）を示す。

（2-3）HBs抗原陽性血清の測定

（2-2）検量線の作成の項における標準HBs抗原液20 μ lの代わりに、HBs抗原陽性血清20 μ lを用いたことの他は、（2-2）項と同様にして吸光度変化を求めた。得られた吸光度変化量を上記検量線にあてはめて、HBs抗原陽性血清中のHBs抗原力価を求めた。なお、HBs抗原陽性血清としては、6検体（検体名称A, B, C, D, E, F）について測定し、それぞれの血清について繰り返し回数5を行い、平均値とその変動係数（CV）（%）求めた。結果を表1に示した。

表 1

患者名	血清中のHBs抗原力価 (I. U. /ml)	変動係数 (%)
A	8.5	7
B	6.3	8
C	8.9	8
D	10.5	4
E	5.4	9
F	3.2	9

表1の結果より、本発明の免疫測定法を用いると、10 I. U. /ml以下の微量な力価の血清も測定可能であることが分かる。

（実施例2）

(1) 免疫測定試薬の調製

可磁化粒子 (Fe_2O_3) 含有ポリスチレンラテックス (粒径 $0.4\ \mu\text{m}$ 、ベリタス社製) の 0.02 重量%リン酸緩衝液 ($\text{pH } 5.0$ 、 $50\ \text{mM}$) 分散液を 25°C で保持したもの $1\ \text{ml}$ 中に、抗ヒトHBs抗原
5 ヤギ抗体 $0.05\ \text{mg}$ 、および、西洋ワサビペルオキシダーゼ $0.05\ \text{mg}$ を添加し、 25°C で1時間攪拌した。

次に、 $15000\ \text{rpm}$ で15分間、遠心分離を行い、上清を除き、
沈殿物をリン酸緩衝液 ($\text{pH } 5.0$ 、 $50\ \text{mM}$) $1\ \text{ml}$ に分散させ試薬
Aとした。

10 可磁化粒子 (Fe_2O_3) 含有ポリスチレンラテックス (粒径 $0.4\ \mu\text{m}$ 、ベリタス社製) の 0.02 重量%リン酸緩衝液 ($\text{pH } 5.0$ 、 $50\ \text{mM}$) 分散液を 25°C で保持したもの $1\ \text{ml}$ 中に、抗ヒトCRPヤギ
抗体 $0.05\ \text{mg}$ 、および、 β -ガラクトシダーゼ $0.75\ \text{mg}$ を添加
し、 25°C で1時間攪拌した。

15 次に、 $15000\ \text{rpm}$ で15分間、遠心分離を行い、上清を除き、
沈殿物をリン酸緩衝液 ($\text{pH } 5.0$ 、 $50\ \text{mM}$) $1\ \text{ml}$ に分散させ試薬
Bとした。

上記試薬A及び試薬Bを1:1の比率で混合し、第1試薬とした。

20 次に、抗西洋ワサビペルオキシダーゼモノクローナル抗体の $0.4\ \text{mg}/\text{ml}$ 溶液の $1\ \text{ml}$ 、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スル
ホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリンの $1\ \text{mg}/\text{ml}$ 溶液の $1\ \text{ml}$ 、 $2\ \text{mM}$ の4-アミノアンチピリン溶液の $1\ \text{ml}$ 、および、 $10\ \text{mM}$
の過酸化水素溶液の $1.2\ \text{ml}$ をリン酸緩衝液 ($\text{pH } 7.0$ 、 $50\ \text{mM}$) $10\ \text{ml}$ に溶解し、試薬Cとした。

25 次に、抗 β -ガラクトシダーゼモノクローナル抗体の $0.4\ \text{mg}/\text{ml}$ 溶液の $1\ \text{ml}$ 、o-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド $0.$

1 g をリン酸緩衝液 (pH 7.0, 50 mM) 10 ml に溶解し、試薬 D とした。

上記試薬 C 及び試薬 D を 1 : 1 の比率で混合し、第 2 試薬とした。

すなわち、本実施例の免疫測定試薬は、上記第 1 試薬と第 2 試薬とからなる。

(2) 次に、この免疫測定試薬を用いて、標準 HBs 抗原および標準 CRP の両方を含むヒト血清検体を用いて測定し、標準 HBs 抗原および標準 CRP による検量線を作成し、次いで HBs 抗原陽性、かつ、CRP 陽性血清を検体として、その中の HBs 抗原力価および CRP 濃度を測定した。

(2-1) 標準 HBs 抗原および標準 CRP の両方を含むヒト血清検体

HBs 抗原を 0 I. U. / ml、かつ、標準 CRP を 0 mg / dl 含む血清検体；HBs 抗原を 10 I. U. / ml、かつ、標準 CRP を 1 mg / dl 含む血清検体；HBs 抗原を 25 I. U. / ml、かつ、標準 CRP を 2.5 mg / dl 含む血清検体；HBs 抗原を 50 I. U. / ml、かつ、標準 CRP を 5 mg / dl 含む血清検体；HBs 抗原を 75 I. U. / ml、かつ、標準 CRP を 7.5 mg / dl 含む血清検体；HBs 抗原を 100 I. U. / ml、かつ、標準 CRP を 10 mg / dl 含む血清検体を標準品として使用した。

(2-2) 検量線の作成

日立分光光度計 U 3200 型を用いて測定した。上記 (2-1) 項の標準 HBs 抗原および標準 CRP の両方を含むヒト血清検体 20 μ l と上記第 1 試薬 120 μ l とを混合し、37℃で 10 分保持した後、上記第 2 試薬 120 μ l を添加し、その 10 分後に、磁石を用いて不溶性担体を反応容器底部に引きつけ、上清の溶液の吸光度を 600 nm と 42

0 nmで測定した。

得られた測定値について、吸光度 600 nmのものについては、標準 HBs 抗原を含有するそれぞれの血清で得られた値から、標準 HBs 抗原濃度 0 I. U. /ml の血清で得られた値を差し引いて、吸光度変化値とした。

得られた測定値について、吸光度 420 nmのものについては、標準 CRP を含有するそれぞれの血清で得られた値から、標準 CRP 濃度 0 mg / dl の血清で得られた値を差し引いて、吸光度変化値とした。

標準 HBs 抗原力価と吸光度変化の関係、および、標準 CRP と吸光度変化の関係の検量線を図 2 に示した。図 2 において、縦軸は 600 nm または 420 nm における吸光度変化量を、横軸は血清中の HBs 抗原力価 (I. U. /ml) または CRP 濃度 (mg / dl) を示す。

(2-3) HBs 抗原陽性、かつ、CRP 陽性血清の測定

(2-2) 検量線の作成の項における標準 HBs 抗原および標準 CRP の両方を含むヒト血清検体 20 μ l の代わりに、HBs 抗原陽性、かつ、CRP 陽性血清 20 μ l を用いたことの他は、(2-2) 項と同様にして吸光度変化を求めた。得られた吸光度変化量を上記検量線にあてはめて、HBs 抗原陽性、かつ、CRP 陽性血清中の HBs 抗原力価および CRP 濃度を求めた。なお、HBs 抗原陽性、かつ、CRP 陽性血清としては、6 検体 (検体名称 A, B, C, D, E, F) について測定し、それぞれの血清について繰り返し回数 5 で行い、平均値とその変動係数 (CV) (%) を求めた。結果を表 2 および表 3 に示した。

表 2

患者名	血清中のHBs抗原力価 (I. U. /ml)	変動係数 (%)
A	8.5	7
B	6.3	8
C	8.9	8
D	10.5	4
E	5.4	9
F	3.2	9

表 3

患者名	CRP濃度 (mg/dl)	変動係数 (%)
A	0.8	10
B	2	8
C	1	4
D	0.5	14
E	0.4	14
F	0.2	18

表2及び表3の結果より、本発明の免疫測定法を用いると、HBs抗原力価が10 I. U. /ml以下の微量な力価の血清も、微量なCRP抗原濃度と同時に測定可能であることが分かる。

(実施例3)

(1) 試薬および材料

ラテックス：10% (W/V) ポリスチレンラテックス (粒径0.4

μ m、積水化学工業社製)

ラテックス希釈用緩衝液：50 mMの第1リン酸ナトリウムと50 mMの第2リン酸ナトリウムをpH 6.5となるように混合したもの

5 C型肝炎ウイルスコア抗原 (p22)：酵母菌で発現させた recombinant C型肝炎ウイルスコア抗原 (オーストラル・バイオロジカルズ社製) 抗原希釈用緩衝液：上記ラテックス希釈用緩衝液に同じ

抗西洋ワサビペルオキシダーゼモノクローナル抗体：腹水から硫酸沈殿によりイムノグロブリン分画にまで精製した抗西洋ワサビペルオキシダーゼモノクローナル抗体

10 抗体希釈用緩衝液：上記ラテックス希釈用緩衝液に同じ

酵素液 (R3液)：西洋ワサビペルオキシダーゼ (257 U/mL、東洋紡社製) を上記ラテックス希釈用緩衝液にて0.3 U/mLに希釈したもの

15 基質液 (R4液)：10 mM N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン (同仁化学社製) 8 μ L、4 mM 4-アミノアンチピリン (和光純薬社製) 40 μ L、12 mM過酸化水素水 (三徳化学社製) 3 μ Lを混合して使用した。

20 ブロッキング用緩衝液：上記ラテックス希釈用緩衝液にウシ血清アルブミン (Fraction V、Miles Corp. 社製) を1% (W/V) になるように、またNaN₃ を0.1% (W/V) になるように添加したもの。

検体希釈用希釈液 (R1液)：ブロッキング用緩衝液に、ポリエチレングリコール6000 (平均分子量7500、和光純薬社製) を1% (W/V) になるように添加したもの。

25 C型肝炎ウイルス検体：C型肝炎ウイルス陽性患者血清 (INTERGEN社製)

(2) ラテックス試薬の調製

ポリスチレンラテックス1容に、ラテックス希釈用緩衝液2容を添加し、3.3% (W/V) ラテックス液を得た。C型肝炎ウイルスコア抗原および抗西洋ワサビペルオキシダーゼモノクローナル抗体は、タンパク濃度が800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるようにそれぞれ抗原または抗体希釈用緩衝液で希釈し、抗原液および抗体液とした。

上記3.3% (W/V) ラテックス液300 μL を25℃のインキュベータ中でマグネチックスターラーで攪拌しながら、ここへ上記抗原液および抗体液それぞれ100 μL ずつを素早く添加し、25℃にて1時間攪拌した。

次に、ブロッキング用緩衝液を0.5 mL添加し、25℃にて続けて1時間攪拌した。次に、この混合液を15℃、18000 rpmで20分間、遠心分離を行った。得られた沈殿に、ブロッキング用緩衝液を2 mL添加し、上記と同様に遠心分離することにより、沈殿を洗浄した。洗浄操作は3回行った。この沈殿にブロッキング用緩衝液を2 mL添加し、よく攪拌した後、超音波破碎機にて分散処理を行い、固形分0.25% (W/V) のラテックス試薬を得た。これを4℃で保存した。

(3) C型肝炎ウイルス検体の測定方法

上記のラテックス試薬 (C型肝炎ウイルスコア抗原という抗原と、抗西洋ワサビペルオキシダーゼモノクローナル抗体という酵素阻害剤とを担持させた不溶性担体)、酵素液および基質液からなる本発明の免疫測定試薬を用い、生化学用自動分析装置7170型 (日立製作所社製) を用いて以下のようにして、C型肝炎ウイルス検体の測定を行った。

上記(2)で得られた固形分0.25% (W/V) のラテックス試薬をそのままR2液とした。測定条件は以下の通りである。

検体容量

20 μL

	検体希釈用希釈液 (R 1 液)	1 8 0 μ L
	ラテックス試薬 (R 2 液)	2 0 μ L
	酵素液 (R 3 液)	2 0 μ L
	基質液 (R 4 液)	2 0 μ L
5	測定波長	6 0 0 n m
	測定温度	3 7 $^{\circ}$ C

試薬の投入順序は、上記自動分析装置のセルに入れた検体に R 1 液を投入し、1 分後に R 2 液、その 4 分後に R 3 液、その 5 分後に R 4 液を投入する。基質液 (R 4 液) を添加してから、約 7 5 秒後の吸光度と約 7 3 0 秒後の吸光度の吸光度の差 ($\Delta OD 6 0 0 n m$) を測定し、この吸光度の差を 1 0 0 0 0 倍したものを吸光度変化量とした。

(4) 測定結果

C 型肝炎ウイルス陽性患者血清 5 検体 (それぞれ検体名称を検体イ、ロ、ハ、ニ、ホとする) を検体とし、2 段階希釈によって 2^{10} 倍まで希釈したサンプルを用意した。上記 (3) の測定方法に従って、各サンプルの吸光度変化を測定し、カットオフ値 (吸光度変化量の 4 0) 以上のものを +、カットオフ値未満のものを - とした。これらの測定結果を表 4 に示した。

(比較例 1)

20 (1) 試薬および材料

実施例 3 の「(1) 試薬および材料」と同様である。

(2) ラテックス試薬の調製

実施例 3 の「(2) ラテックス試薬の調製」においては、ポリスチレンラテックスに、C 型肝炎ウイルスコア抗原および抗西洋ワサビペルオキシダーゼモノクローナル抗体を担持させたが、比較例 1 では抗西洋ワサビペルオキシダーゼモノクローナル抗体を使用しなかったことの他は、

実施例 3 の「(2) ラテックス試薬の調製」と同様に操作し、C 型肝炎ウイルスコア抗原のみが担持されたラテックス試薬を調製した。

(3) C 型肝炎ウイルス検体の測定方法

5 上記のラテックス試薬を用い、生化学用自動分析装置 7 1 7 0 型（日立製作所社製）を用いて以下のようにして、C 型肝炎ウイルス検体の測定を行った。

上記 (2) で得られた固形分 0. 2 5 % (W/V) のラテックス試薬をそのまま R 2 液とした。測定条件は以下の通りである。

	検体容量	2 0 μ L
10	検体希釈用希釈液 (R 1 液)	2 1 0 μ L
	ラテックス試薬 (R 2 液)	3 0 μ L
	測定波長	7 0 0 nm
	測定温度	3 7 $^{\circ}$ C

15 試薬の投入順序は、上記自動分析装置のセルに入れた検体に R 1 液を投入し、5 分後に R 2 液を投入する。ラテックス試薬 (R 2 液) を添加してから、約 5 5 秒後の吸光度と約 3 0 0 秒後の吸光度の吸光度の差 ($\Delta OD 7 0 0$ nm) を測定し、この吸光度の差を 1 0 0 0 0 倍したものを吸光度変化量とした。

(4) 測定結果

20 実施例 3 で用いたものと同様の C 型肝炎ウイルス陽性患者血清を検体とし、2 段階希釈によって 2^{10} 倍まで希釈したサンプルを用意した。上記 (3) の測定方法に従って、各サンプルの吸光度変化を測定し、カットオフ値 (吸光度変化量の 8 0) 以上のものを +、カットオフ値未満のものを - とした。これらの測定結果を表 4 に示した。

25 (比較例 2)

(1) 試薬および測定方法

C型肝炎ウイルス抗体測定用E I Aキットとして、市販のE I Aキット（H C V・E I A II、ダイナボット社製）を用い、検体中の抗体量をキット添付の操作法に従って測定した。

（２）測定結果

- 5 実施例３で用いたものと同様のC型肝炎ウイルス陽性患者血清を検体とし、２段階希釈によって 2^{10} 倍まで希釈したサンプルを用意した。上記（２）の測定方法に従って、各サンプルの吸光度を測定し、カットオフ値（キットに付属の陽性、陰性コントロールの吸光度から算出）以上のものを＋、カットオフ値未満のものを－とした。これらの測定結果を
- 10 表４に示した。

15

20

25

表 4

			希 積 倍 率							
			2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ¹⁰
5 <										

表 4 から明らかなように、本発明の免疫測定試薬による測定結果（実施例 3）は、市販の E I A 法による測定結果（比較例 2）と同等であったが、従来のラテックス試薬による測定結果（比較例 1）とは、低濃度域および高濃度域のいずれにおいても一致しなかった。

(实施例 4)

(1) 試薬および材料

以下に示すもの以外は、実施例 3 の「(1) 試薬および材料」に同じ。

可磁化物質含有ラテックス：可磁化物質 (Fe_2O_3) 含有、10% (W/V) ポリスチレンラテックス (粒径 $0.4\ \mu\text{m}$ 、ベリタス社製)

5 抗ヒト HBs 抗体：山羊の抗血清からイムノグロブリン分画にまで精製した山羊抗ヒト HBs 抗体

抗ヒト CRP 抗体：山羊の抗血清からイムノグロブリン分画にまで精製した山羊抗ヒト CRP 抗体

10 抗 β ガラクトシダーゼモノクローナル抗体：腹水から硫酸沈殿によりイムノグロブリン分画にまで精製した抗 β ガラクトシダーゼモノクローナル抗体

酵素液 (R 3 液)：西洋ワサビペルオキシダーゼ ($257\ \text{U/mL}$ 、東洋紡社製) を前記ラテックス希釈用緩衝液にて $0.3\ \text{U/mL}$ に希釈したものと、 β ガラクトシダーゼ ($500\ \text{U/mL}$ 、東洋紡社製) を前記ラテックス希釈用緩衝液にて $0.3\ \text{U/mL}$ に希釈したものとを 1 : 15 1 で混合したもの

基質液 (R 4 液)： $10\ \text{mM}$ N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン (同仁化学社製) $8\ \mu\text{L}$ 、 $4\ \text{mM}$ 4-アミノアンチピリン (和光純薬社製) $40\ \mu\text{L}$ 、 $12\ \text{mM}$ 過酸化水素水 (三徳化学社製) $3\ \mu\text{L}$ を混合した溶液に、 0.20 ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド (ONPG) を 1% (W/V) 濃度となるように混合したもの

HBs 標準品：ヒトプール血清から精製された HBs 標準品 ($1000\ \text{I.U. / mL}$ 、 $1.7\ \mu\text{g / mL}$) を生理食塩水にて 400 、 200 、 100 、 50 、 $10\ \text{I.U. / mL}$ にそれぞれ希釈して使用した。
25 また、HBs 標準品を含まない生理食塩水のみのもを $0\ \text{I.U. / mL}$ として用いた。

C R P 標準品：ヒトプール血清から精製されたC R P 標準品（デンカ生研社製）40、20、10、5、1 mg / d Lを使用した。また、C R P 標準品を含まない生理食塩水のみのもを0 mg / d Lとして用いた。

5 反応停止液：リン酸一ナトリウム100 mM水溶液

(2) ラテックス試薬の調製

可磁化物質含有ポリスチレンラテックス1容に、ラテックス希釈用緩衝液2容を添加し、3.3% (W/V) ラテックス液を得た。抗ヒトH B s 抗体、抗ヒトC R P 抗体、抗西洋ワサビペルオキシダーゼモノクローナル抗体および抗 β ガラクトシダーゼモノクローナル抗体は、タンパク濃度が1600 μ g / mLになるようにそれぞれ抗体希釈用緩衝液で希釈し抗体液とした。

15 上記3.3% (W/V) ラテックス液300 μ Lを25℃のインキュベータ中でマグネチックスターラーで攪拌しながら、ここへ上記抗体液それぞれ100 μ Lずつを素早く添加し、25℃にて1時間攪拌した。

次に、ブロッキング用緩衝液を0.5 mL添加し、25℃にて続けて1時間攪拌した。次に、この混合液を15℃、18000 rpmで20分間、遠心分離を行った。得られた沈殿に、ブロッキング用緩衝液を2 mL添加し、上記と同様に遠心分離することにより、沈殿を洗浄した。

20 洗浄操作は3回行った。この沈殿にブロッキング用緩衝液を2 mL添加し、よく攪拌した後、超音波破碎機にて分散処理を行い、固形分0.25% (W/V) のラテックス試薬を得た。これを4℃で保存した。

(3) ヒトH B s、ヒトC R P 検体の測定方法

25 上記のラテックス試薬（抗ヒトH B s 抗体および抗ヒトC R P 抗体という抗体と、抗西洋ワサビペルオキシダーゼモノクローナル抗体および抗 β ガラクトシダーゼモノクローナル抗体という酵素阻害剤とを担持さ

せた不溶性担体)、酵素液および基質液からなる本発明の免疫測定試薬を用い、分光光度計装置U-3200型(日立製作所社製)を用いて以下のようにして、ヒトHBS、ヒトCRP検体の測定を行った。

- 上記(2)で得られた固形分0.25%(W/V)のラテックス試薬
5 をそのままR2液とした。測定条件は以下の通りである。

1 検体当たりの試薬投入量

	検体容量	1 mL
	検体希釈用希釈液(R1液)	1.8 mL
	ラテックス試薬(R2液)	0.2 mL
10	酵素液(R3液)	0.2 mL
	基質液(R4液)	0.2 mL
	反応停止液	2 mL
	測定波長	600 nmおよび420 nm
	測定温度	37℃

- 15 試薬の投入順序は、検体容器に入れた検体にR1液を投入し、3分後にR2液、その10分後にR3液、その10分後にR4液、その10分後に反応停止液を投入する。反応停止液を投入してから、検体容器下部から磁石を用いて可磁化物質含有ラテックス粒子を吸い寄せ、検体容器下部に沈殿させる。しかる後、上清の吸光度を600 nmおよび420
20 nmで測定した。

得られた測定値について、吸光度600 nmのものについては、検体として以下に示すHBS標準品を含む標準品検体を用いて得られた値から、検体として生理食塩水のみを用いて得られた値を差し引いて吸光度変化量とした。

- 25 得られた測定値について、吸光度420 nmのものについては、検体として以下に示すCRP標準品を含む標準品検体を用いて得られた値か

ら、検体として生理食塩水のみを用いて得られた値を差し引いて吸光度変化量とした。

(4) 測定結果

5 試薬および材料の項に示したH B s 標準品およびC R P 標準品を用いて、H B s 標準品およびC R P 標準品の両方を含む以下の標準品検体を調製した。

10 H B s 標準品を0 I . U . / m L、かつ、C R P 標準品を0 m g / d L含むもの（すなわち、生理食塩水のもの）；H B s 標準品を10 I . U . / m L、かつ、C R P 標準品を1 m g / d L含むもの；H B s 標準品を50 I . U . / m L、かつ、C R P 標準品を5 m g / d L含むもの；H B s 標準品を100 I . U . / m L、かつ、C R P 標準品を10 m g / d L含むもの；H B s 標準品を200 I . U . / m L、かつ、C R P 標準品を20 m g / d L含むもの。

15 H B s 標準品およびC R P 標準品の両方を含む標準品検体を検体として、上記（3）に従って、各濃度のそれぞれの標準品検体の吸光度変化量を測定した。得られた吸光度変化量（600 nm）とH B s 標準品濃度（I . U . / m L）との関係、および、吸光度変化量（420 nm）とC R P 標準品濃度（m g / d L）との関係を表5に示した。

表 5

20

H B s 標準品濃度 (IU/mL)	10	50	100	200
吸光度変化 (600nm)	0.118	0.601	1.211	2.434
C R P 標準品濃度 (mg/dL)	1	5	10	20
吸光度変化 (420nm)	0.101	0.214	1.041	2.112

25

表5の結果より検量線を作成した。

次いで、3種類の血清検体（検体名称としてA、B、Cとする）を用いて、上記（3）に従って、それぞれの血清検体の吸光度変化量を測定した。得られた吸光度変化量を上記の検量線にあてはめて、血清検体中のH B s 濃度およびC R P 濃度を求め、結果を表6に示した。

5

表 6

10

検体	H B s 濃度 (I U / m L)	C R P 濃度 (m g / d L)
A	2 4	1 . 2
B	5 8	2 . 3
C	1 3 3	4 . 1

この結果から、本実施例による測定試薬および測定方法は、汎用性が高く、簡便に同時多項目測定が可能なものであることが確認できた。

15

（実施例5）

（1）試薬作製

20

抗 β -ガラクトシダーゼ抗体（ウサギ由来ポリクローナル抗体）I g G 1 m g / m l （水溶液）の1 m l に、S M C C （N-サクシイミジル-4-（N-マレイミドメチル）-1-カルボキシレート）4 m g / m l （ジメチルホルムアミド溶液）の20 μ l を加えて、30℃で10分間攪拌し、抗 β -ガラクトシダーゼ抗体とS M C C を結合させた。

25

次いで、上記溶液に0.1 M リン酸緩衝液（p H 7.0）を加えて全量10 m l となるまで希釈し、この溶液をファルマシア社製、P D - 10 カラムでゲル濾過し、最初の3 m l を捨て、次の1.5 m l を分取し、抗 β -ガラクトシダーゼ抗体とS M C C 結合体（マレイミド結合抗 β -ガラクトシダーゼ抗体）を取り出した。

次に、上記マレイミド結合抗 β -ガラクトシダーゼ抗体画分1.5 m

1 に、0.1 mg の H C V (C 型肝炎ウイルス) C-100 抗原タンパクを添加し、30℃で60分間攪拌し、H C V C-100 抗原タンパクと抗 β -ガラクトシダーゼ抗体コンジュゲートを生成し、試薬 1 とした。

- 5 次に、 β -ガラクトシダーゼを1 mg/ml となるように、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解したものを10 ml 調製し試薬 2 とした。

- 10 更に、o-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド (ONPG) を、0.1 重量%の濃度となるように、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解したものを10 ml 調製し試薬 3 とした。

即ち、本発明の免疫測定試薬は、上記試薬 1 (酵素阻害剤である抗 β -ガラクトシダーゼ抗体と化学結合した抗原)、試薬 2 (上記酵素阻害剤により活性が阻害される酵素) および試薬 3 (上記酵素の基質) とからなるものである。

- 15 (2) 測定

- C型肝炎患者の検体 A, B, C、および標準血清 0, 1, 2, 4, 8, 16 C O I (C U T O F F I N D E X) を検体とし、検体 100 μ l に試薬 1 を 100 μ l 加え、37℃で10分放置し、その後、試薬 2 を 200 μ l 加え、37℃で10分放置し、さらに、試薬 3 を 100 20 0 μ l 加えて 37℃で10分放置した。その後、420 nm の吸光度を測定し、標準血清で得られた吸光度値と標準血清の C O I とから検量線を作成し、検体 A, B, C で得られた吸光度値を上記検量線にあてはめて、検体 A, B, C の C O I を求めた。その結果、検体 A は 8 C O I、検体 B は 4 C O I、検体 C は 5 C O I であった。

- 25 (実施例 6)

(1) 試薬作製

抗 β -ガラクトシダーゼモノクローナル抗体 IgG 1 mg/ml
(水溶液)の1 mlに、SMCC 4 mg/ml (ジメチルホルムアミ
ド溶液)の20 μ lを加えて、30℃で10分間攪拌し、抗 β -ガラク
トシダーゼ抗体とSMCCを結合させた。

- 5 次いで、上記溶液に0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0)を加えて全
量10 mlとなるまで希釈し、この溶液をファルマシア社製、PD-1
0カラムでゲル濾過し、最初の3 mlを捨て、次の1.5 mlを分取し、
抗 β -ガラクトシダーゼ抗体とSMCC結合体 (マレイミド結合抗 β -
ガラクトシダーゼ抗体)を取り出した。

- 10 次に、上記マレイミド結合抗 β -ガラクトシダーゼ抗体画分1.5 m
lに、0.1 mgのHCV (C型肝炎ウイルス) C-100抗原タン
パクを添加し、30℃で60分間攪拌し、HCV C-100抗原タン
パクと抗 β -ガラクトシダーゼ抗体コンジュゲートを生成し、試薬1と
した。

- 15 次に、 β -ガラクトシダーゼを1 mg/mlとなるように、0.1 M
リン酸緩衝液 (pH 7.0)に溶解したものを10 ml調製し試薬2と
した。

- 20 更に、o-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシドを、0.1
重量%の濃度となるように、0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0)に溶
解したものを10 ml調製し試薬3とした。

即ち、本発明の免疫測定試薬は、上記試薬1 (酵素阻害剤である抗 β -
ガラクトシダーゼモノクローナル抗体と化学結合した抗原)、試薬2
(上記酵素阻害剤により活性が阻害される酵素) および試薬3 (上記酵
素の基質) とからなるものである。

- 25 (2) 測定

C型肝炎患者の検体D, E, F、および標準血清0, 1, 2, 4, 8,

1 6 C O I (C U T O F F I N D E X) を検体とし、検体 1 0 0
μ l に試薬 1 を 1 0 0 μ l 加え、3 7 ° C で 1 0 分放置し、その後、試薬
2 を 2 0 0 μ l 加え、3 7 ° C で 1 0 分放置し、さらに、試薬 3 を 1 0 0
0 μ l 加えて 3 7 ° C で 1 0 分放置した。その後、4 2 0 n m の吸光度を
5 測定し、標準血清で得られた吸光度値と標準血清の C O I とから検量線
を作成し、検体 D, E, F で得られた吸光度値を上記検量線にあてはめ
て、検体 D, E, F の C O I を求めた。その結果、検体 D は 2 C O I、
検体 E は 1 5 C O I、検体 F は 9 C O I であった。

1 0 発明の効果

本願の第 1 の発明に係る免疫測定試薬では、上記 (a) 抗体または抗
原と酵素とが担持された不溶性担体、(b) 酵素阻害剤、及び (c) 基
質を含むので、該免疫測定試薬を試料と混合し、抗原抗体反応による不
溶性担体の凝集反応と酵素反応とを引き起し、生じたこれらの反応の度
1 5 合いを測定することにより、試料中の抗原または抗体などの超微量成分
を高感度で測定することができる。また、B / F 分離を必要としないの
で、測定を簡便に行うことができる。

同様に、第 2 の発明に係る免疫測定試薬においても、(a) 抗体また
は抗原と酵素阻害剤とが担持された不溶性担体と、(b) 酵素と、(c) 基質とを含むので、試料と混合し、抗原抗体反応による不溶性担体
2 0 の凝集反応と酵素反応とを引き起し、これらの反応の度合いを測定する
ことにより、試料中の抗原または抗体などの超微量成分を高感度で測定
することができる。第 2 の発明においても、測定に際し B / F 分離を必
要としないか、あるいは B / F 分離を簡便化することができるので、簡
便に測定を行うことができる。
2 5

さらに、第 3 の発明に係る免疫測定試薬は、上記 (a) 酵素阻害剤と

化学結合された抗体または抗原と、(b) 酵素と、(c) 基質とを含むので、試料と混合した場合に、抗原抗体反応と酵素反応とが生じ、これらの反応の度合いを測定することにより、試料中の抗原または抗体などの超微量成分を高感度で測定することができる。

- 5 また、第3の発明に係る免疫測定試薬を用いた場合においても、B/F分離を必要とせず、あるいはB/F分離を簡便化し得るので、測定を簡便に行うことができる。

- 10 本発明に係る免疫測定法では、第1、第2または第3の発明に係る免疫測定試薬を用いるので、上述したように、試料中の抗原または抗体などの超微量成分を高感度で測定でき、かつB/F分離を必要としないか、あるいは簡便化し得るので、測定を簡便に行うことができる。

15

20

25

請 求 の 範 囲

1. 試料中の測定対象物質である抗原または抗体の量を測定するための免疫測定試薬であって、
 - 5 (a) 上記抗原または抗体に対する抗体または抗原と酵素とが担持された不溶性担体と、
 - (b) 上記酵素の活性を阻害する酵素阻害剤と、
 - (c) 上記酵素の基質とを含むことを特徴とする、免疫測定試薬。
- 10 2. 上記不溶性担体を含む第 1 の試薬と、
上記酵素阻害剤及び上記基質を含む第 2 の試薬とからなることを特徴とする請求項 1 に記載の免疫測定試薬。
3. 試料中の測定対象物質である抗原または抗体の量を測定するための免疫測定試薬であって、
 - 15 (a) 上記抗原または抗体に対する抗体または抗原と酵素阻害剤とが担持された不溶性担体と、
 - (b) 上記酵素阻害剤により活性が阻害される酵素と、
 - (c) 上記酵素の基質とを含むことを特徴とする免疫測定試薬。
- 20 4. 上記不溶性担体を含む第 1 の試薬と、
上記酵素を含む第 2 の試薬と、上記酵素の基質を含む第 3 の試薬とからなることを特徴とする請求項 3 に記載の免疫測定試薬。
5. 上記不溶性担体中に、磁性物質または可磁化物質が含有されていることを特徴とする請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の免疫測定試薬。
- 25 6. 抗体または抗原、酵素及び酵素の基質の組み合わせが複数含有されていることを特徴とする請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の免疫測定試薬。

7. 試料中の測定対象物質である抗原または抗体の量を測定するための免疫測定試薬であって、

(a) 酵素阻害剤と化学結合されており、かつ上記抗原または抗体に対する抗体または抗原と、

5 (b) 上記酵素阻害剤により活性が阻害される酵素と、

(c) 上記酵素の基質

とを含むことを特徴とする免疫測定試薬。

8. 上記酵素阻害剤と化学結合された抗体または抗原を含む第1の試薬と、上記酵素を含む第2の試薬と、上記酵素の基質を含む第3の試薬と

10 からの請求項7に記載の免疫測定試薬。

9. 上記酵素阻害剤が、上記酵素に対する抗体である請求項1～8のいずれかに記載の免疫測定試薬。

10. 前記酵素に対する抗体が、モノクローナル抗体である請求項9に記載の免疫測定試薬。

15 11. 試料中の測定対象物質である抗原または抗体の量を測定するための免疫測定法であって、請求項1～10のいずれかに記載の免疫測定試薬と、試料とを混合し、抗原抗体反応による凝集反応と酵素反応を生じさせ、生じた反応の度合いを測定することを特徴とする免疫測定法。

20

25

図 1

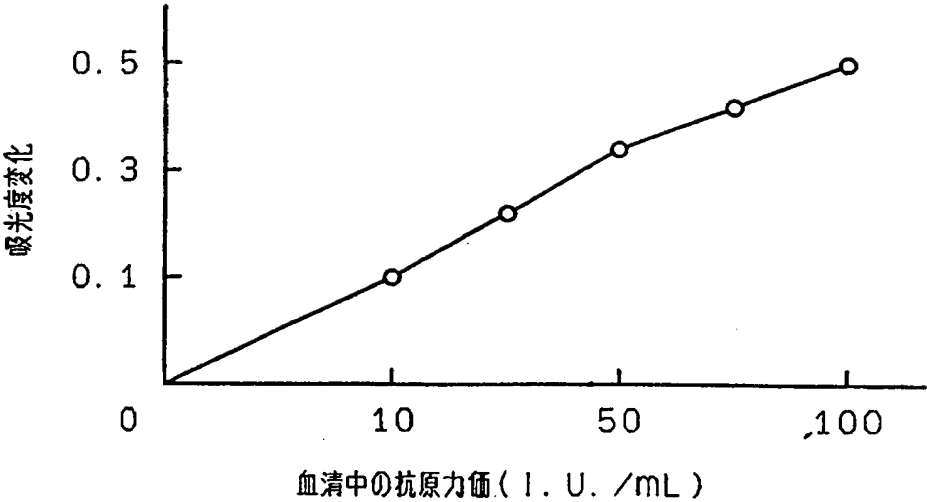
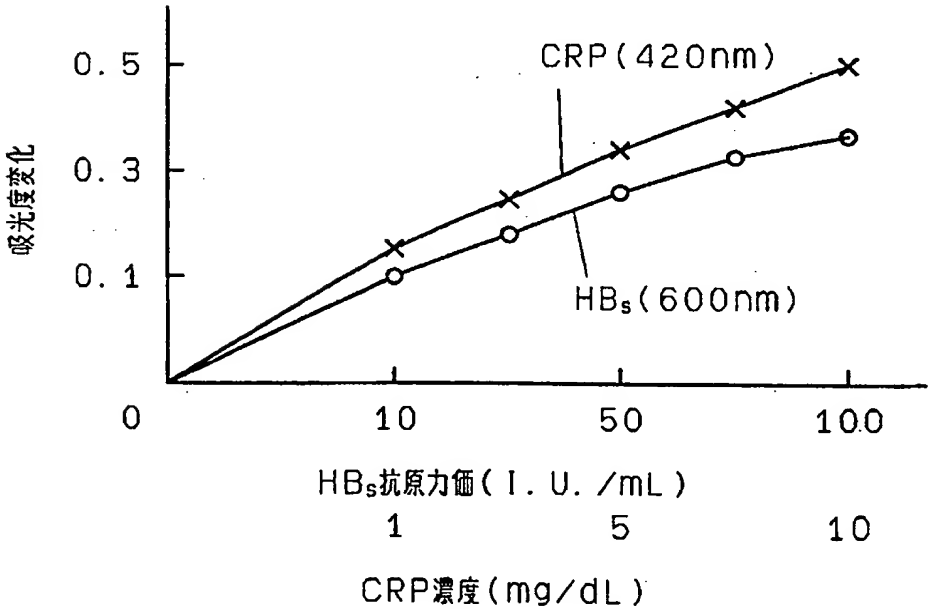


図 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02442

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ G01N33/543, G01N33/542

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ G01N33/543, G01N33/542

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1999
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1999 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-1999

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 60-067857, A (Fujirebio Inc.), 18 April, 1985 (18. 04. 85), Claims (Family: none)	1-6
X	JP, 62-249061, A (Konica Corp.), 30 October, 1987 (30. 10. 87), Claims (Family: none)	3-6
X	JP, 53-115814, A (F. Hoffmann-La Roche & Co., AG.), 9 October, 1978 (09. 10. 78), Claims & DE, 2811257, A & FR, 2384262, A & GB, 1595101, A	7-10
A	JP, 63-049095, A (Unitika Ltd.), 1 March, 1988 (01. 03. 88), Claims & EP, 261781, A	9, 10
A	JP, 1-311274, A (Nitto Denko Corp.), 15 December, 1989 (15. 12. 89), Claims (Family: none)	11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

 Date of the actual completion of the international search
 10 June, 1999 (10. 06. 99)

 Date of mailing of the international search report
 22 June, 1999 (22. 06. 99)

 Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl^o G01N33/543, G01N33/542

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl^o G01N33/543, G01N33/542

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-1999年
 日本国登録実用新案公報 1994-1999年
 日本国実用新案登録公報 1996-1999年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 60-067857, A (富士レリオ株式会社) 18. 4月. 1985 (18. 04. 85) 5) 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-6
X	JP, 62-249061, A (小西六写真工業株式会社) 30. 10月. 1987 (30. 10. 87) 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	3-6
X	JP, 53-115814, A (エフ・ホフマン・ラ・ロシュ・ウント・コンパニー・アクチエンゲゼルシャフト) 9. 10月. 1978 (09. 10. 78) 特許請求の範囲&DE, 2811257, A&FR, 2384262, A&GB, 1595101, A	7-10
A	JP, 63-049095, A (ユニチカ株式会社) 1. 3月. 1988 (01. 03. 88) 特許請求の範囲&EP, 261781, A	9, 10
A	JP, 1-311274, A (日東電工株式会社) 15. 12月. 1989 (15. 12. 89) 9) 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	11

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10. 06. 99

国際調査報告の発送日

22.06.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加々美一恵

2 J

9408

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

THIS PAGE BLANK (USPTO)

AMENDMENT

(Under Article 11 of Japanese Law Concerning
International Applications, etc. Pursuant to PCT)

To : Director General of the Patent Office

1. Identification of the International Application

PCT/JP99/02442

2. Applicant

Name : Sekisui Chemical Co., Ltd.

Address : 4-4, Nishitemma 2-chome,
Kita-ku, Osaka-shi,
Osaka 530-8565 JAPAN

Country of nationality : Japan

Country of residence : Japan

3. Agent

Name : (8659) Patent Attorney MIYAZAKI Chikara

Address : Nishimura Bldg., 6-5,
Tanimachi 1-chome, Chuo-ku, Osaka-shi,
Osaka 540-0012 JAPAN

4. Item to be Amended

Specification and claims

5. Contents of the Amendment

(1) In the specification, "(a) an insoluble carrier for

THIS PAGE BLANK (USPTO)

carrying an enzyme and an antibody or antigen corresponding to the aforementioned antigen or antibody," on page 4, line 9 (English specification: Page 6, lines 6-8) is replaced by "(a) an insoluble carrier for carrying an enzyme and an antibody or antigen corresponding to the aforementioned antigen or antibody, the aforementioned insoluble carrier comprising at least one selected from the group consisting of an organic polymer powder particle, microorganism, blood cell and cell membrane fragment,".

(2) In the specification, "(a) an insoluble carrier for carrying an enzyme inhibitor and an antibody or antigen corresponding to the aforementioned antigen or antibody," on page 4, line 16 (English specification: Page 6, lines 19-21) is replaced by "(a) an insoluble carrier for carrying an enzyme inhibitor and an antibody or antigen corresponding to the aforementioned antigen or antibody, the aforementioned insoluble carrier comprising at least one selected from the group consisting of an organic polymer powder particle, microorganism, blood cell and cell membrane fragment,".

(3) Claim 1 is amended by changing "(a) an insoluble carrier which carries an enzyme and an antibody or antigen corresponding to said antigen or antibody;" to "(a) an insoluble carrier which carries an enzyme and an antibody or antigen corresponding to said antigen or antibody, said insoluble carrier comprising at least one selected from the group consisting of an organic polymer powder particle, microorganism, blood cell and cell membrane fragment;".

THIS PAGE BLANK (USPT)

Also, Claim 3 is amended by changing "(a) an insoluble carrier which carries an enzyme inhibitor and an antibody or antigen corresponding to said antigen or antibody;" to "(a) an insoluble carrier which carries an enzyme inhibitor and an antibody or antigen corresponding to said antigen or antibody, said insoluble carrier comprising at least one selected from the group consisting of an organic polymer powder particle, microorganism, blood cell and cell membrane fragment;".

6. List of Attached Documents

New pages of specification: pages 4 and 4/1
(English specification: Pages 6 and 6a)

New pages of claims: pages 37 and 37/1
(English claims: Pages 55 and 55a)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT COOPERATION TREATY



From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

**NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT**

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

MIYAZAKI, Chikara
Nishimura Building
6-5, Tanimachi 1-chome
Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka 540-0012
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 05 July 1999 (05.07.99)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference F-370PCT	
International application No. PCT/JP99/02442	International filing date (day/month/year) 12 May 1999 (12.05.99)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 15 May 1998 (15.05.98)
Applicant SEKISUI CHEMICAL CO., LTD. et al	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c)** which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c)** which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
15 May 1998 (15.05.98)	10/133995	JP	02 July 1999 (02.07.99)
24 Dece 1998 (24.12.98)	10/366818	JP	02 July 1999 (02.07.99)
24 Dece 1998 (24.12.98)	10/366819	JP	02 July 1999 (02.07.99)
24 Dece 1998 (24.12.98)	10/366820	JP	02 July 1999 (02.07.99)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Juan Cruz

Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7T
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference F-370PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/02442	International filing date (day/month/year) 12 May 1999 (12.05.99)	Priority date (day/month/year) 15 May 1998 (15.05.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 33/543		
Applicant SEKISUI CHEMICAL CO., LTD.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>4</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 19 July 1999 (19.07.99)	Date of completion of this report 11 April 2000 (11.04.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/02442

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
 pages 1-3,5-36, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages 4,4/1, filed with the letter of 24 December 1999 (24.12.1999)
- ☒ the claims:
 pages 2,4-11, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages 1,3, filed with the letter of 24 December 1999 (24.12.1999)
- ☒ the drawings:
 pages 1, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/02442

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-11	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-11	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-11	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: JP, 60-067857, A (Fujirebio Inc.) 18 April 1985 (18.04.85)
 Document 2: JP, 62-249061, A (Konica Corp.) 30 October 1987 (30.10.87)
 Document 3: JP, 53-115814, A (F. Hoffmann-La Roche & Co., AG.) 9 October 1978 (09.10.78)
 Document 4: JP, 01-311274, A (Nitto Denko Corp.) 15 December 1989 (15.12.89)

Claims 1, 2, 5 and 6

Document 1 describes an immunoassay reagent for measuring the quantity of antigen or antibody that is the object of assay in a sample and states that this reagent contains an insoluble carrier on which an antibody or antigen to the above antigen or antibody and an enzyme are carried, an enzyme inhibitor that inhibits activity of the above enzyme, and the substrate for the above enzyme.

The use of an organic polymer powder, microorganisms, blood cells, or fragments of cell membrane as the insoluble carrier in an immunoassay is a matter that is to be selected as needed by persons skilled in the art.

Claims 3, 4, 5, and 6

Documents 1 and 2 describe an immunoassay reagent for measuring the quantity of antigen or antibody that is the object of assay in a sample and state that this reagent contains an insoluble carrier on which an antibody or antigen to the above antigen or antibody and an enzyme inhibitor are carried, an enzyme whose activity is inhibited by the above enzyme inhibitor, and the substrate for the above enzyme.

Claims 7-10

Document 3 describes an immunoassay reagent for measuring the quantity of antigen or antibody that is the object of assay in a sample and states that this reagent contains an insoluble carrier on which an antibody or antigen to the above antigen or antibody that is chemically bonded to an enzyme inhibitor is carried, an enzyme whose activity is inhibited by the above enzyme inhibitor, and the substrate for the above enzyme.

Claim 11

Document 4 describes an immunoassay method in which an agglutination reaction and enzymatic reaction are brought about by the immunoassay process and the extent of the reaction that occurs is measured.

Applying the immunoassay method described in document 4 to the immunoassay reagents described in documents 1-3 is obvious to persons skilled in the art.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

9T

特 許 協 力 条 約

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 26 MAY 2000

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 F-370PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/02442	国際出願日 (日.月.年) 12.05.99	優先日 (日.月.年) 15.05.98
国際特許分類 (IPC) Int. Cl ⁷ G01N33/543		
出願人 (氏名又は名称) 積水化学工業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☒ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で 4 ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 19.07.99	国際予備審査報告を作成した日 11.04.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 竹中靖典	2 J 9507
電話番号 03-3581-1101 内線 3252		

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書 第 1-3, 5-36 ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 4, 4/1 ページ、 24.12.99 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 請求の範囲 第 2, 4-11 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 1, 3 項、 24.12.99 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 図面 第 1 ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-11	有
	請求の範囲		無
進歩性(IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-11	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-11	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: JP, 60-067857, A (富士レビオ株式会社) 18. 4月. 1985 (18. 04. 85)
 文献2: JP, 62-249061, A (小西六写真工業株式会社) 30. 10月. 1987 (30. 10. 87)
 文献3: JP, 53-115814, A (エフ・ホフマン・ラ・ロシュ・ウント・コンパニー・アク
 チエンゲゼルシャフト) 9. 10月. 1978 (09. 10. 78)
 文献4: JP, 01-311274, A (日東電工株式会社) 15. 12月. 1989 (15. 12. 89)

請求項1, 2, 5, 6について

文献1には、試料中の測定対象物質である抗原または抗体の量を測定するための免疫試薬であって、上記抗原または抗体に対する抗体または抗原と酵素が担持された不溶性担体と、上記酵素の活性を阻害する酵素阻害剤と、上記酵素の基質とを含む免疫測定試薬が記載されている。

また免疫分析の不溶性担体として、有機高分子粉末、微生物、血球および細胞膜片などを使用することは、当業者が適宜選択しうる事項である。

請求項3, 4, 5, 6について

文献1, 2には試料中の測定対象物質である抗原または抗体の量を測定するための免疫測定試薬であって、上記抗原または抗体に対する抗体または抗原と酵素阻害剤とか担持された不溶性担体と、上記酵素阻害剤により活性が阻害される酵素と、基質とを含有する免疫測定試薬が記載されている。

請求項7-10について

文献3には、試料中の測定対象物質である抗原または抗体の量を測定するための免疫測定試薬であって、酵素阻害剤と化学結合されており、かつ上記抗原または抗体に対する抗体または抗原と、上記酵素阻害剤により活性が阻害される酵素と、上記酵素の基質とを含有する免疫測定試薬が記載されている。

請求項11について

文献4には、免疫測定法による凝集反応と酵素反応を生じさせ、生じた反応の度合いを測定する免疫測定法が記載されている。

文献1~3に記載された免疫測定試薬を文献4に記載された免疫測定方法に適用することは、当業者にとって自明である。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

発明の要約

本発明の目的は、上述した従来技術の欠点を解消し、試料中の抗原または抗体などの超微量成分を高感度で測定することができ、B/F分離を必要としないか、あるいはB/F分離を簡便化して、簡便に上記超微量成分を測定することを可能とする免疫測定試薬および免疫測定法を提供することにある。

本願の第1の発明は、試料中の測定対象物質である抗原または抗体の量を測定するための免疫測定試薬であって、(a) 上記抗原または抗体に対する抗体または抗原と酵素とが担持されており、かつ有機高分子粉末、微生物、血球及び細胞膜片からなる群より選ばれた少なくとも1種の不溶性担体と、(b) 上記酵素の活性を阻害する酵素阻害剤と、(c) 上記酵素の基質とを含むことを特徴とする。

第1の発明の特定の局面では、上記不溶性担体を含む第1の試薬と、上記酵素阻害剤及び上記基質を含む第2の試薬とが用意される。

本願の第2の発明は、試料中の測定対象物質である抗原または抗体の量を測定するための免疫測定試薬であって、(a) 上記抗原または抗体に対する抗体または抗原と酵素阻害剤とが担持されており、かつ有機高分子粉末、微生物、血球及び細胞膜片からなる群より選ばれた少なくとも1種の不溶性担体と、(b) 上記酵素阻害剤により活性が阻害される酵素と、(c) 上記酵素の基質とを含むことを特徴とする。

第2の発明に係る免疫測定試薬の特定の局面では、上記不溶性担体を含む第1の試薬と、上記酵素を含む第2の試薬と、上記基質を含む第3の試薬とが用意される。

第1、第2の発明に係る免疫測定試薬では、好ましくは、不溶性担体中に、磁性物質または可磁化物質が含有される。

また、第1、第2の発明に係る免疫測定試薬では、上記抗体または抗

THIS PAGE BLANK (USPTO)

原、酵素阻害剤及び酵素の組み合わせが複数用いられ、それによって複数種の抗原または抗体の量を測定することができる。

5

10

15

20

25

THIS PAGE BLANK (USPTO)

請 求 の 範 囲

1. (補正後) 試料中の測定対象物質である抗原または抗体の量を測定するための免疫測定試薬であって、
- 5 (a) 上記抗原または抗体に対する抗体または抗原と酵素とが担持されており、かつ有機高分子粉末、微生物、血球及び細胞膜片からなる群から選択された少なくとも1種である不溶性担体と、
- (b) 上記酵素の活性を阻害する酵素阻害剤と、
- (c) 上記酵素の基質
- 10 とを含むことを特徴とする、免疫測定試薬。
2. 上記不溶性担体を含む第1の試薬と、
- 上記酵素阻害剤及び上記基質を含む第2の試薬とからなることを特徴とする請求項1に記載の免疫測定試薬。
3. (補正後) 試料中の測定対象物質である抗原または抗体の量を測定
- 15 するための免疫測定試薬であって、
- (a) 上記抗原または抗体に対する抗体または抗原と酵素阻害剤とが担持されており、有機高分子粉末、微生物、血球及び細胞膜片からなる群から選択した少なくとも1種である不溶性担体と、
- (b) 上記酵素阻害剤により活性が阻害される酵素と、
- 20 (c) 上記酵素の基質
- とを含むことを特徴とする免疫測定試薬。
4. 上記不溶性担体を含む第1の試薬と、
- 上記酵素を含む第2の試薬と、上記酵素の基質を含む第3の試薬とからなることを特徴とする請求項3に記載の免疫測定試薬。
- 25 5. 上記不溶性担体中に、磁性物質または可磁化物質が含有されていることを特徴とする請求項1～4のいずれかに記載の免疫測定試薬。

THIS PAGE BLANK (USPT)

6. 抗体または抗原、酵素及び酵素の基質の組み合わせが複数含有されていることを特徴とする請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の免疫測定試薬。

5

10

15

20

25

THIS PAGE BLANK (USPT)

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 F-370PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/02442	国際出願日 (日.月.年) 12.05.99	優先日 (日.月.年) 15.05.98
出願人(氏名又は名称) 積水化学工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
第 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ G01N33/543, G01N33/542

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ G01N33/543, G01N33/542

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-1999年
 日本国登録実用新案公報 1994-1999年
 日本国実用新案登録公報 1996-1999年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 60-067857, A (富士レビオ株式会社) 18. 4月. 1985 (18. 04. 8 5) 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-6
X	JP, 62-249061, A (小西六写真工業株式会社) 30. 10月. 1987 (3 0. 10. 87) 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	3-6
X	JP, 53-115814, A (エフ・ホフマン・ラ・ロシュ・ウント・コン パニー・アクチエンゲゼルシャフト) 9. 10月. 1978 (09. 10. 78) 特許請求の範囲&DE, 2811257, A&FR, 2384262, A&GB, 1595101, A	7-10
A	JP, 63-049095, A (ユニチカ株式会社) 1. 3月. 1988 (01. 03. 88) 特許請求の範囲&EP, 261781, A	9, 10
A	JP, 1-311274, A (日東電工株式会社) 15. 12月. 1989 (15. 12. 8 9) 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10. 06. 99

国際調査報告の発送日

22.06.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA / JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加々美一恵

2 J

9408

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

THIS PAGE BLANK (USPTO)